

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. April 2004 (01.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/027091 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009923

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. September 2003 (08.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 43 303.8 13. September 2002 (13.09.2002) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: NORDHEIM, Alfred [DE/DE]; Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen (DE). KAMMER, Winfried [DE/DE]; Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen (DE). WEISS, Stefanie [DE/DE]; Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen (DE). VUONG, Giang, Lam [DE/DE]; Auf der Morgenstelle 15, 72076 Tübingen (DE).

(74) Anwalt: RUFF, WILHELM, BEIER, DAUSTER & PARTNER; Kronenstrasse 30, 70174 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING BIOMOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DETEKTION VON BIOMOLEKÜLEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting biomolecules, particularly peptides, proteins, carbohydrates, glycoproteins, proteoglycans and/or nucleic acids by using a metal compound in the presence of at least one bifunctional agent.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Detektion von Molekülen, insbesondere von Peptiden, Proteinen, Kohlehydraten, Glycoproteinen, Proteoglykanen und/oder Nukleinsäuren mittels einer Metallverbindung in Gegenwart mindestens eines mindestens bifunktionellen Agens.



WO 2004/027091 A1

BeschreibungVerfahren zur Detektion von Biomolekülen

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion von Biomolekülen mittels einer Metallverbindung in Gegenwart mindestens eines mindestens bifunktionellen Agenses.

- 10 Die Detektion und Charakterisierung von Biomolekülen ist von fundamentaler Bedeutung für die biologische Forschung und die klinische Medizin. Insbesondere bei der Suche nach Mutationsereignissen sowie bei der Diagnostik genetisch bedingter Erkrankungen werden regelmäßig Detektions- und Charakterisierungsverfahren für unterschiedliche
- 15 Biomoleküle eingesetzt.

Als Biomoleküle wird hier insbesondere die Gruppe, bestehend aus Peptiden, Proteinen, Glycoproteinen, Proteoglykanen, Kohlehydraten und Nukleinsäuren, verstanden.

Für den ersten Schritt der Detektion, die Auftrennung dieser Moleküle, werden derzeit zumeist ein- oder zweidimensionale Gelelektrophorese-Systeme eingesetzt. Elektrophorese bedeutet eine Auftrennung geladener Teilchen durch Einfluss eines elektrischen Feldes. Für die Elektrophorese können verschiedene Trägermaterialien eingesetzt werden, unter anderem Agarose-Gele, Zelluloseacetatgele oder Polyacrylamidgele. Aufgrund der im Vergleich zu Agarosegelen höheren Trennwirkung werden für die Proteincharakterisierung bevorzugt Polyacrylamidgele eingesetzt. Nach abgeschlossener gelelektrophoretischer Trennung müssen die Biomoleküle auf dem Trägermaterial sichtbar gemacht werden. Hierfür existieren verschiedene Visualisierungstechniken wie z. B. die Coomassie-Blau Färbung, Fluoreszenzmarkierung, radioaktive Markierung, Ethidiumbromidfärbung und Silberfärbung. Bei allen aufgeführten Methoden existieren große Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität, des zeitlichen und materiellen Aufwandes, wie auch der Umweltverträglichkeit und Gesundheitsschädlichkeit der verwendeten Reagenzien bzw. der entstehenden Abfälle. So ist z. B. die Coomassie-Blau-Färbung sehr einfach durchzuführen, besitzt dafür allerdings eine sehr geringe Sensitivität. Vor allem bei der radioaktiven Markierung oder der Ethidiumbromidfärbung entstehen unerwünschte radioaktive bzw. kanzerogene Abfälle. Die Fluoreszenzmarkierung besitzt den Nachteil eines relativ großen apparativen Aufwandes. Die Silberfärbung ist gegenüber der Coomassie-Blau Färbung ca. einhundertfach sensitiver, es entstehen keine radioaktiven oder kanzerogenen Abfälle und der instrumentelle Aufwand ist relativ gering. Daher ist die Silberfärbung die derzeit am häufigsten eingesetzte Färbemethode zur Visualisierung von Proteinen. Die Silberfärbung besitzt jedoch den entscheidenden Nachteil, daß sie bei entsprechender erwünschter Sensitivität sehr zeitaufwendig ist. Dies ist jedoch vor allem in der modernen medizinischen Diagnostik und Life-Science-Forschung ein entscheidender Nachteil.

Die verschiedenen Silberfärbemethoden lassen sich prinzipiell in zwei Gruppen, je nach verwendeter Silberverbindung, einteilen. Man unterscheidet zwischen Silbernitratfärbung und Silberdiaminfärbung. Näheres hierzu siehe Electrophoresis 13, 429-439 (1992) von T. Rabilloud.

- 5 Ein weiterer Unterschied zwischen den unterschiedlichen Visualisierungstechniken sowie innerhalb der verschiedenen Variationen der Silberfärbung besteht in der Verfügbarkeit der Moleküle für weitere Charakterisierungsmethoden, insbesondere die massenspektrometrische Untersuchung. Bei vielen Visualisierungsmethoden bzw. bisherigen Silberfärbungen liegt das Molekül nach der Detektion in einer chemisch veränderten Form vor und steht daher einer massenspektrometrischen Untersuchung nicht mehr oder nur in einer für die Charakterisierung unzureichenden Form zur Verfügung.
- 10
- 15 Unabhängig von der exakten Färbemethode und der Verfahrensführung ist den meisten Silberfärbungen die Abfolge der Schritte Fixierung, Sensitivierung, Silberschritt (Inkubation mit einer Lösung, die Silberionen enthält), Entwickeln und Stoppen der Reaktion gemeinsam.
- 20 Zur Fixierung der Moleküle werden die Gele zunächst mit einer sauren alkoholischen Lösung inkubiert. Anschließend wird ein Sensitivierungsschritt durchgeführt, in welchem die Gele mit Reduktionsmitteln wie Glutaraldehyd, DTT, Dithionit oder Thiosulfat inkubiert werden. Diese sind für die Reduktion von Silberionen an der Oberfläche der Biomoleküle zu kleinsten Mengen an metallischem Silber verantwortlich und dienen im Entwicklungsschritt als Keimzelle für weiteren Niederschlag an Silber (Näheres hierzu siehe in Electrophoresis 11, 785-794 (1990) von T. Rabilloud). Nach einem Waschschrift, bei dem überschüssiges Reduktionsmittel entfernt wird, findet die Silberfärbung/Silberimpräg-
- 25
- 30 nierung des Gels mittels Silbernitrat- bzw. Silberdiaminlösung statt. Nach diesem Silberschritt wird das Gel erneut gewaschen und anschließend mit einer Entwicklungslösung, die, entweder Formaldehyd und

Natriumcarbonat oder Formaldehyd und Zitronensäure enthält, entwickelt. Nach abgeschlossener Entwicklung wird das Gel in einer Stopplösung inkubiert, um den Entwicklungsvorgang abzustoppen. Stopplösungen enthalten in der Regel Tris/Essigsäure, Zitronensäure oder Komplexbildner, wie beispielsweise EDTA oder EGTA.

Alle derzeit bekannten Methoden besitzen entweder den Nachteil, daß sie mit > 5 bis 24 h Silberfärbedauer sehr langwierig sind, um dabei eine relativ hohe Sensitivität zu erreichen, oder sie sind von vergleichsweise kurzer Dauer, d. h. < 5 h, aber dabei weniger sensitiv. Außerdem existieren relativ sensitive Silberfärbemethoden, die jedoch keine zufriedenstellende massenspektrometrische Untersuchung der Biomoleküle im Anschluss an die Detektion zulassen.

Wesentliches Ziel der Erfindung ist es, ein schnelles und gleichzeitig sehr sensitives Silberfärbeverfahren zu entwickeln, welches eine, sich an die Detektion anschließende, massenspektrometrische Charakterisierung der Biomoleküle zulässt.

Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Detektionsverfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 und den Kit mit den Merkmalen des Anspruchs 22 gelöst. Bevorzugte Ausführungen sind in den abhängigen Ansprüchen 2 bis 21 sowie 23 und 24 dargestellt. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt dieser Beschreibung gemacht.

Erfindungsgemäß wird bei einem Verfahren zur Detektion von Biomolekülen, insbesondere von Peptiden, Proteinen, Glycoproteinen, Proteoglycanen, Kohlehydraten und/oder Nukleinsäuren, mittels einer Metallverbindung ein bifunktionelles Agens eingesetzt, welches einen hydrophoben und einen reduzierenden Teil besitzt. Es ist auch möglich, daß das Agens mehr als einen hydrophoben Teil und/oder mehr als einen

reduzierenden Teil besitzt. Es ist ebenfalls denkbar, mehr als ein mindestens bifunktionelles Agens zur Detektion einzusetzen.

Gemäß der Erfindung handelt es sich bei dem bifunktionellen Agens um
5 ein Molekül der allgemeinen Form X-R, wobei es sich bei dem Teil X des bifunktionellen Agens vorzugsweise um den reduzierenden Teil handelt.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Teil X insbesondere um einen linearen oder homo- und/oder heterozyklischen
10 Kohlenwasserstoff.

Der Teil X besitzt vorzugsweise mindestens eine Hydroxylgruppe, mindestens eine Sulfhydrylgruppe, mindestens eine Carbonylgruppe, mindestens eine Thiosulfatgruppe und/oder mindestens eine ungesättigte
15 Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung.

In einer besonderen Ausführungsform handelt es sich bei X um ein Molekül mit antioxidativen Eigenschaften, vorzugsweise um ein Vitamin, insbesondere aus der Gruppe Vitamin A, Vitamin C und/oder Vitamin E.
20 In einer besonderen Ausführungsform handelt es sich bei dem Teil X des biofunktionellen Agens um Ascorbinsäure.

Gemäß der Erfindung handelt es sich bei R um den hydrophoben Teil des bifunktionellen Agens.

25 In einer besonderen Ausführungsform handelt es sich bei R um einen gesättigten Kohlenwasserstoff. Es ist auch denkbar, daß es sich bei R um einen mindestens einfach ungesättigten Kohlenwasserstoff handelt. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei R um
30 einen Acyloxy-Rest der allgemeinen Form $-O-CO-C_nH_{(2n+1)}$, wobei n vorzugsweise 8 - 21, insbesondere 11 - 17 und insbesondere bevorzugt 15, ist.

In einer besonderen Ausführungsform handelt es sich bei dem bifunktionellen Agens um Ascorbylpalmitat. Es ist jedoch auch denkbar, daß es sich um Ascorbylstearat, Ascorbylmyristat oder Ascorbyllaurat handelt.

5

Gemäß der Erfindung kann das bifunktionelle Agens während der Detektion in einer Endkonzentration von 10^{-5} bis 1 %, vorzugsweise von 10^{-4} bis 0,1 %, insbesondere 5×10^{-4} bis 5×10^{-3} %, vorliegen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform beträgt die Endkonzentration
10 des bifunktionellen Agens 10^{-3} %.

Gemäß der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der Metallverbindung um eine Silberverbindung, insbesondere um Silbernitrat. In einer anderen Ausführungsform kann es sich bei der Silberverbindung auch
15 um ein Silberdiamin handeln.

Bei den zu detektierenden Nukleinsäuren handelt es sich vorzugsweise um DNA oder RNA.

20 In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die zu detektierenden Moleküle für die Detektion auf oder in einem Träger angebracht. Im Falle von Proteinen handelt es sich bei dem Träger vorzugsweise um ein Polyacrylamidgel. Im Falle von DNA handelt es sich bei dem Träger vorzugsweise um Agarosegele. Im Falle von RNA
25 ist je nach Größe der RNA-Fragmente die Verwendung von Agarosegelelen oder von Polyacrylamidgelen denkbar. In einer anderen Ausführungsform handelt es sich bei dem Trägermaterial um eine Membran, insbesondere eine PVDF- oder Nitrozellulose-Membran. Es ist auch denkbar, daß es sich bei dem Träger um einen Microarray-Träger, ins-
30 besondere um einen Biochip, handelt. Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch zum Färben von Proteinen aus Zellen, welche mittels LCM

(laser capture microdissection) aus einem Gewebe herausgelöst wurden, eingesetzt werden.

5 Gemäß der Erfindung umfasst das Verfahren zur Detektion der Biomoleküle mindestens die folgenden Schritte: Zunächst werden die Moleküle durch Inkubieren mit einer Fixierlösung auf oder in dem Träger fixiert, anschließend wird der Träger mit den Molekülen in mindestens einem Waschschrift mit einer ersten Waschlösung und anschließend mit einer
10 zweiten Waschlösung gewaschen. Im anschließenden Metallbindungsschrift wird das Trägermaterial mit den darauf oder darin fixierten Molekülen mit einer Lösung der Metallverbindung inkubiert und im anschließendem Waschschrift mit reinstem Wasser gewaschen. Hieran schließt sich der Entwicklungsschrift mit einer Entwicklungslösung und der abschließende Stepschrift an.

15

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kann das bifunktionelle Agens im Fixierschrift, insbesondere als Zusatz zur Fixierlösung, eingesetzt werden. Die Fixierlösung kann neben dem bifunktionellen Agens 20 - 50 %, insbesondere 40 %, Ethanol enthalten.

20

Gemäß einer Ausführungsform wird das bifunktionelle Agens in einer mindestens teilweise alkoholischen Lösung eingesetzt. Vorzugsweise handelt es sich bei der alkoholischen Lösung um eine ethanolische Lösung, insbesondere aus absolutem Ethanol.

25

In dem erfindungsgemäßen Verfahren kann im Entwicklungsschrift ein Komplexbildner, insbesondere EDTA, als Bestandteil der Entwicklungslösung eingesetzt werden. In einer anderen Ausführungsform kann als Komplexbildner auch EGTA verwendet werden.

30

Als weitere Bestandteile kann die Entwicklungslösung neben dem Komplexbildner auch Natriumcarbonat, Natriumthiosulfat und/oder ein redu-

zierendes Reagens, vorzugsweise aus der Gruppe der Aldehyde, enthalten. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem reduzierenden Reagens um Formaldehyd.

- 5 Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann nach der Detektion der Biomoleküle eine weitere Charakterisierung, vorzugsweise eine massenspektrometrische Untersuchung, insbesondere eine Identifizierung der Biomoleküle mittels MALDI-MS oder mit ESI-MS, durchgeführt werden.

10

Die Erfindung umfasst weiterhin einen Kit zur Detektion von Biomolekülen, welcher mindestens ein mindestens bifunktionelles Agens enthält. Das im Kit enthaltene bifunktionelle Agens besitzt mindestens einen hydrophoben und mindestens einen reduzierenden Teil. Das bifunktionel-

- 15 le Agens liegt in einer Ausführungsform des Kits in der Fixierlösung vor. Der erfindungsgemäße Kit umfasst weiterhin mindestens eines der sich auf das bifunktionelle Agens beziehenden Merkmale der Patentansprüche 2 bis 11, wie sie oben bereits erläutert wurden.

- 20 Der Kit umfasst außerdem das Merkmal des sich auf den Entwicklungsschritt beziehenden Anspruchs 19. Auf diese Erläuterung wird nunmehr im Zusammenhang mit dem Kit ausdrücklich Bezug genommen und verwiesen.

- 25 Im folgenden wird das erfindungsgemäße Verfahren durch ausführliche Beschreibung von besonderen Ausführungsformen sowie durch Figuren erläutert. In diesen Ausführungsformen können einzelne Merkmale der Erfindung allein oder in Kombination mit anderen Merkmalen verwirklicht sein. Die beschriebenen besonderen Ausführungsformen dienen lediglich zur Erläuterung und zum besseren Verständnis der Erfindung und
30 sind in keiner Weise einschränkend zu verstehen.

Im übrigen ist die Erfindung anhand der Figuren dargestellt; dabei bedeuten:

Figur 1 zeigt die Sensitivität der Proteinfärbemethoden

5

Figur 2 zeigt ausgewählte Proteinspots für die massenspektrometrische Identifizierung am Beispiel eines mit kolloidalem Coomassie gefärbten 2D-Gels. Bei den anderen Färbungen wurden die korrespondierenden Spots für die MS-Identifizierung ausgewählt.

10

Figur 3 zeigt die MALDI-MS Sequenzabdeckung in %

Figur 4 (bestehend aus den Teilen 4A, 4B, und 4C) zeigt die Protein-identifizierung mit ESI-MS nach tryptischem Verdau dargestellt in einer

15 Tabelle bestehend aus den Teilen A, B und C.

Figurenbeschreibung

Figur 1 zeigt die unterschiedlichen Sensitivitäten der Proteinfärbung für die drei bekannten Proteinfärbemethoden nach Hochstrasser (siehe experimenteller Teil), Amersham Biosciences Plus One Silver Staining Kit (#17-1150-01) und dem Fluoreszenzfärbeverfahren SYPRO Ruby von Bio-Rad (# 170-3125), sowie das erfindungsgemäße neue Färbeverfahren. Das neue Verfahren zur Detektion von Biomolekülen ist mindestens um den Faktor 30 sensitiver als die bisher bekannten Methoden nach Hochstrasser und Amersham Biosciences und darüber hinaus deutlich sensitiver als die Markierung durch einen Fluoreszenzfarbstoff nach der Methode mit SYPRO Ruby. Die konventionellen Silberfärbemethoden, beispielsweise die Methode nach Hochstrasser oder Amersham Biosciences, besitzen zumeist den Nachteil, daß sie aufgrund der Verwendung von Glutaraldehyd als Sensitivierungsmittel im Sensitivierungsschritt die zu detektierenden Biomoleküle nach der Detektion einer anschließenden massenspektrometrischen Untersuchung nicht mehr oder nur unzureichend zugänglich sind. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Detektion von Biomolekülen verwendet jedoch anstelle des Glutaraldehyds ein bifunktionelles Molekül, welches nicht die Nachteile des Glutaraldehyds besitzt und die Identifizierung der Biomoleküle durch Massenspektrometrie nach der Detektion ermöglicht. Zum Beweis dafür, daß Proteine nach erfolgter Detektion mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrensmittels massenspektrometrischer Methoden identifiziert werden können, wurde ein vergleichendes Experiment durchgeführt. Die in Figur 2 markierten 15 Proteinspots wurden aus vier 2-D-Gelen ausgewählt, die parallel mit vier unterschiedlichen Färbemethoden eingefärbt wurden. Bei den vier Färbemethoden handelte es sich erstens um die klassische kolloidale Coomassie-(G250)-Färbung, die als massenspektrometriekompatibel bekannt ist. Bei der zweiten Methode handelt es sich um die erfindungsgemäße Silberfärbemethode, welche im experimentellen Teil näher beschrieben ist. Bei der dritten Methode

handelt es sich um die Färbung nach Hochstrasser unter Verwendung von Glutaraldehyd. Bei der vierten Methode handelt es sich um die Färbung mit dem Plus One Silver Staining Kit von Amersham Biosciences, ebenfalls unter Verwendung von Glutaraldehyd.

5

Im Anschluss an die unterschiedlichen Färbeverfahren wurden die einzelnen Proteinspots extrahiert und anschließend sowohl mittels MALDI-MS und ESI-MS untersucht. Die Ergebnisse dieser Proteinidentifizierungen sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt.

10

Figur 3 zeigt für die Spots Nr. 1 bis Nr. 15 die Sequenzabdeckung nach einer MALDI-MS in Prozent für die vier unterschiedlichen Proteinfärbemethoden. Es wurde die durchschnittliche Sequenzabdeckung für jede Methode bestimmt. Werte in Klammern wurden bei der Durchschnittsbildung nicht einbezogen, da die gefundenen Peptidmassen von verschiedenen Isoformen eines Proteins stammen könnten und so kein eindeutiger Wert für die Sequenzabdeckung bestimmbar ist. Bei dieser massenspektrometrischen Bestimmung erwies sich die erfindungsgemäße Silberfärbemethode mit 19 % Sequenzabdeckung sogar der klassischen Färbung mit kolloidalem Coomassie (17,1 % Sequenzabdeckung) als überlegen. Dies zeigt deutlich die Eignung des erfindungsgemäßen Detektionsverfahrens für eine im Anschluss an die Detektion durchgeführte massenspektrometrische Identifizierung der Biomoleküle. Die Ergebnisse der beiden Färbemethoden nach Hochstrasser (6,3 % Sequenzabdeckung) und der Färbung mittels des Kits von Amersham Biosciences (9 % Sequenzabdeckung) zeigen deutlich eine Beeinträchtigung der Identifizierbarkeit, durch, die auf die Verwendung von Glutaraldehyd zurückgeführt werden kann. Die insgesamt sehr niedrigen Sequenzabdeckungswerte resultieren aus den geringen Proteinmengen, welche für dieses vergleichende Experiment eingesetzt wurden.

30

Figur 4 zeigt eine Darstellung der wiedergefundenen Aminosäuren von ausgewählten Peptiden aus den einzelnen Proteinspots und die Ermittlung der Sequenzabdeckung. Auch die Detektion mittels ESI-MS zeigt deutlich die Eignung des erfindungsgemäßen Detektionsverfahrens im Vergleich zur Methode nach Hochstrasser oder Amersham Biosciences. Die Sequenzabdeckung der neuen Silberfärbemethode betrug ebenso wie die der kolloidalen Coomassiefärbung 67 %, im Gegensatz zu 35 % bei den beiden anderen Methoden (Hochstrasser und Amersham Biosciences).

Experimenteller Teil

Das für die unterschiedlichen Färbungen verwendete Proteingemisch wurde auf folgende Weise aus murinen embryonalen Stammzellen erhalten: 10 Mio. Zellen wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zentrifugiert und das Pellet anschließend mit einem Lysepuffer, bestehend aus 9 M Harnstoff, 4 % CHAPS (Cholamidopropyldimethylammonio-propansulfonat), 1 % DTT (Dithio-threitol), 1 % Pharmalyte (pH 3-10) und 0,001 % Bromphenolblau lysiert. Die Konzentration der Proteinlösung wurde nach Bradford [Bradford, M. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254, 1976] bestimmt.

Silberfärbung von Biomolekülen:

15

1. Erfindungsgemäße Methode

Die zu färbenden Biomoleküle befinden sich in den Polyacrylamidgelen und werden während der ganzen Färbung auf einem Horizontalschüttler bewegt. Das Wechseln der Lösungen zwischen den einzelnen Färbeschritten kann durch Absaugen der nicht mehr benötigten und Zugabe frischer Lösungen oder durch Umsetzen der Gele in neue Färbeschalen erreicht werden.

25 1. Schritt: Fixieren der Biomoleküle

Das Polyacrylamidgel mit den darin befindlichen Biomolekülen wird in eine Fixierlösung, bestehend aus 40 %igem Ethanol sowie 10^{-3} % Ascorbylpalmitat, gegeben. Die Zugabe des Ascorbylpalmitats erfolgte in Form einer Lösung des Ascorbylpalmitats in absolutem Ethanol. Die Dauer der Fixierung beträgt 30 Minuten.

2. Waschschritte:

Die Gele werden zuerst mit einer 20 %igen und anschließend mit einer 10 %igen Ethanollösung gewaschen. Die Dauer beträgt jeweils 15 Minuten.

3. Silberschritt:

Nach Entfernen der Waschlösung werden die Gele in einer 0,5 %igen Silbernitratlösung für 30 Minuten inkubiert

4. Waschschritt:

Nach Entfernen der Silberlösung werden die Gele für 5 Minuten mit Milli-Q-Wasser gewaschen.

5. Entwicklung:

Die Waschlösung wird entfernt und die Gele werden mit der Entwicklungslösung für ca. 10-20 Minuten entwickelt, bis die gewünschte Intensität der Färbung erreicht ist. Die Entwicklungslösung besteht pro Liter aus 1,4 % Natriumcarbonat, 0,06 % EDTA, 240 µl 10 % Natriumthiosulfat-Lösung sowie 800 µl 37 %ige Formaldehydlösung.

6. Stoppen der Färbung:

Im Anschluss an die Entwicklung wird die Entwicklungslösung entfernt und durch eine Stopplösung ersetzt, welche aus 1,5 % EDTA-Lösung oder aus einer Lösung, bestehend aus 5 % Tris-Base und 2 % Essigsäure, gelegt. Die Dauer des Stopschrittes beträgt 5 Minuten.

2. Färbemethode nach Hochstrasser

Die zu färbenden Biomoleküle befinden sich auf Polyacrylamidgelen und werden während der ganzen Färbung auf einem Horizontalschüttler be-

wegt. Das Wechseln der Lösungen zwischen den einzelnen Färbeschritten kann man z. B. durch Absaugen der nicht mehr benötigten und Zugabe frischer Lösungen, oder durch Umsetzen der Gele in neue Färbeschalen erreichen

5

1. Fixierer 1 (40 % Ethanol + 10 % Essigsäure)
Dauer der Fixierung: 1 h

10

2. Fixierer 2 (5% Ethanol + 5 % Essigsäure)
Dauer der Fixierung: 2 h oder über Nacht

3. Waschschrift mit Milli-Q-Wasser
Dauer: 5 Minuten

15

4. Fixierer 3 (74 g Natriumacetat-Trihydrat pro Liter + 20 ml 50 % Glutaraldehyd pro Liter)
Dauer der Fixierung: 30 Minuten

20

5. 3 Waschschriffe mit Milli-Q-Wasser
Dauer: 3 mal 10 Minuten

6. Inkubation der Gele in Naphthalin-2,6-disulfonsäure
Dauer: 30 Minuten

25

7. Inkubation der Gele in Naphthalin-2,6-disulfonsäure
Dauer: 30 Minuten

8. 4 Waschschriffe mit Milli-Q-Wasser
Dauer: 4 mal 15 Minuten

30

9. Silberschritt

Nach Entfernung der Waschlösung (Milli-Q-Wasser) werden die Gele für 30 Minuten in einer Silberdiaminlösung inkubiert.

Die Silberdiaminlösung besteht aus 8 g Silbernitrat pro Liter, 13,3 ml 25 % Ammoniak und 4 ml 5 M NaOH.

10. 4 Waschritte mit Milli-Q-Wasser

Dauer: 4 mal 4 Minuten

10 11. Entwicklungsschritt

Die Waschlösung wird entfernt und die Gele werden mit der Entwicklerlösung für die Dauer von 5-10 min. entwickelt.

Die Entwicklungslösung besteht aus 100 mg Zitronensäure und 1 ml 37 % Formaldehyd pro Liter

15

12. Stoppschritt

Die Entwicklerlösung wird entfernt und durch eine Stopplösung ersetzt.

Die Stopplösung besteht aus 50 g Tris-Base mit 20 ml Essigsäure.

20

Dauer: 5-10 Minuten

3. Amersham Biosciences Kit

25 Es wurde der Plus One Silver Stain Kit (Protein) verwendet und die Detektion entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

4. SYPRO Ruby

30

Für die Fluoreszenzmarkierung wurde der Kit SYPRO Ruby von Bio-Rad (# 170-3125) verwendet und die Detektion entsprechend dem Herstel-

lerprotokoll mit einem Imagingsystem der Fa. Raytest (Fuji FLA 2000) durchgeführt.

5 5. Kolloidales Coomassie

Die zu färbenden Biomoleküle befinden sich in Polyacrylamidgelen und werden während der ganzen Färbung auf einem Horizontalschüttler bewegt. Das Wechseln der Lösungen zwischen den einzelnen Färbeschritten kann man z. B. durch Absaugen der nicht mehr benötigten und Zugabe frischer Lösungen oder durch Umsetzen der Gele in neue Färbeschalen erreichen

Die kolloidale Coomassie-Lösung besteht aus:

15 2 g Coomassie G250 in 1 l Milli-Q-Wasser gelöst + 55,5 ml 95-97 % Schwefelsäure. Die Lösung wird über Nacht gerührt und anschließend durch einen Filter filtriert. Anschließend werden 220 ml 10 M NaOH und 310 ml 100 % Trichloressigsäure zugegeben.

20 1. Fixierung und Färbung der Gele mit der Kolloidalem Coomassie Lösung
Dauer: über Nacht

25 2. Waschschritt mit Milli-Q-Wasser
Die Färbelösung wird entfernt und mehrmals mit Milli-Q-Wasser gewaschen. Der Waschschritt wird solange durchgeführt, bis der Gelhintergrund auf ein Minimum reduziert ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion von Molekülen, insbesondere von Pepti-
5 den, Proteinen, Kohlehydraten, Glycoproteinen, Proteoglykanen
und/oder Nukleinsäuren mittels einer Metallverbindung in Gegen-
wart mindestens eines mindestens bifunktionellen Agens, wobei
das Agens mindestens einen hydrophoben Teil und mindestens
einen reduzierenden Teil besitzt.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich
bei dem bifunktionellen Agens um ein Molekül der allgemeinen
Form X-R handelt.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß
es sich bei X um den reduzierenden Teil handelt.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, daß es sich bei X um einen linearen oder homo-
20 und/oder heterozyklischen Kohlenwasserstoff handelt.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, daß X vorzugsweise mindestens eine Hydroxyl-
Gruppe, mindestens eine Sulfhydryl-Gruppe, mindestens eine
25 Carbonyl-Gruppe, mindestens eine Thiosulfat-Gruppe und/oder
mindestens eine ungesättigte Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung ent-
hält.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch
gekennzeichnet, daß es sich bei X um ein Molekül mit antioxidati-
30 ven Eigenschaften, beispielsweise um ein Vitamin, vorzugsweise

aus der Gruppe Vitamin A, Vitamin C und/oder Vitamin E, insbesondere um Ascorbinsäure, handelt.

- 5 7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei R um den hydrophoben Teil handelt.
- 10 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei R um einen gesättigten oder mindestens einfach ungesättigten Kohlenwasserstoff, vorzugsweise um einen Acyloxy-, Acyl- und/oder Alkyl-Rest handelt.
- 15 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei R um den Acyloxy-Rest der allgemeinen Form $-O-CO-C_nH_{(2n+1)}$ mit $n = 8-21$, bevorzugt $n = 11-17$, insbesondere $n = 15$, handelt.
- 20 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem bifunktionellen Agens um Ascorbylpalmitat (= Palmitoylascorbinsäure), Ascorbylstearat (= Stearoylascorbinsäure), Ascorbylmyristat (Myristoylascorbinsäure) oder Ascorbyllaurat (Lauroylascorbinsäure) handelt.
- 25 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das bifunktionelle Agens während der Detektion in einer Endkonzentration von 10^{-5} bis 1 % (w/v), bevorzugt von 10^{-4} bis 0,1 % (w/v), insbesondere $5 \cdot 10^{-4}$ bis $5 \cdot 10^{-3}$ (w/v) und bevorzugt 10^{-3} % (w/v), vorliegt.
- 30 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Metallverbindung um eine Silberverbindung, bevorzugt Silbernitrat, handelt.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Nukleinsäuren um DNA oder RNA handelt.
- 5
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Moleküle für die Detektion auf und/oder in einem Träger angebracht werden.
- 10
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Träger um ein Gel, insbesondere ein Polyacrylamid- oder Agarose-Gel, um eine Membran, insbesondere eine PVDF- oder Nitrocellulosemembran und/oder um einen Microarray-Träger, insbesondere einen Biochip, handelt.
- 15
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion der, insbesondere auf oder in dem Träger befindlichen, Moleküle mindestens folgende Schritte umfasst: Fixier-Schritt, mindestens einen Waschschrift, Metallverbindungs-Schritt, Entwicklungsschritt und/oder Stopschritt.
- 20
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das bifunktionelle Agens im Fixierschritt eingesetzt wird und insbesondere in einer Fixierlösung enthalten ist
- 25
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das bifunktionelle Agens in mindestens teilweise alkoholischer Lösung eingesetzt wird, vorzugsweise als Bestandteil der Fixierlösung, wobei es sich bei dem Alkohol vorzugsweise um Ethanol handelt.
- 30

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß ein Komplexbildner, vorzugsweise EDTA und/oder EGTA, im Entwicklungsschritt eingesetzt wird, insbesondere in einer Entwicklungslösung enthalten ist.

5

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Entwicklungslösung ein reduzierendes Agens, bevorzugt aus der Gruppe der Aldehyde, insbesondere Formaldehyd, Natriumcarbonat, den Komplexbildner, und/oder Natriumthiosulfat enthält.

10

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Detektion eine Charakterisierung, insbesondere eine massenspektrometrische Untersuchung, der detektierten Moleküle durchgeführt wird.

15

22. Kit zur Detektion von Molekülen dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens ein mindestens bifunktionelles Agens, wobei das Agens mindestens einen hydrophoben Teil und mindestens einen reduzierenden Teil besitzt, vorzugsweise in einer Fixierlösung, enthält.

20

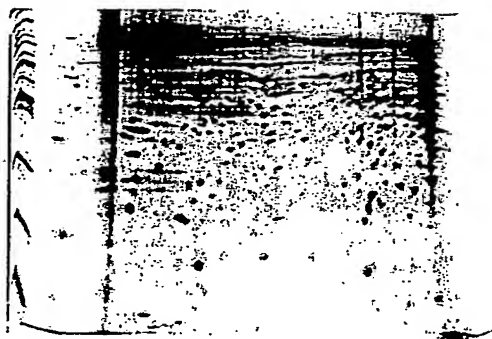
23. Kit nach Anspruch 22, weiter gekennzeichnet durch mindestens eines der Merkmale der Ansprüche 2-11, oder durch Zusatz eines Komplexbildners im Entwicklungsschritt.

25

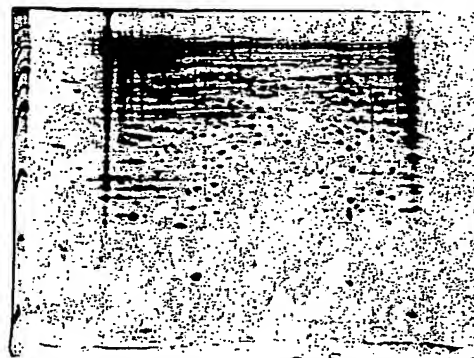
24. Kit nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass im Entwicklungsschritt ein Komplexbildner mit den Merkmalen des Anspruch 19 enthalten ist.

30

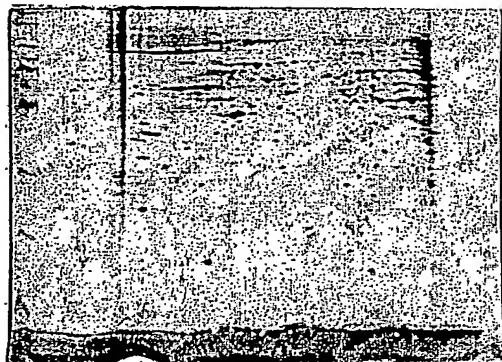
Figur 1



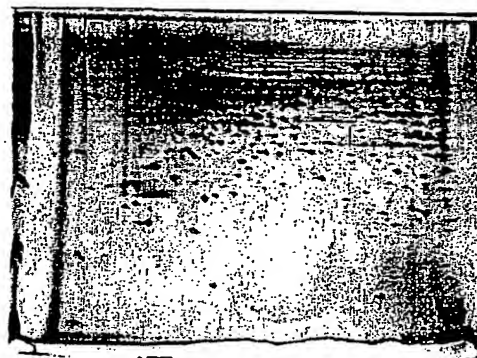
Hochstrasser: 8100 ng



Amersham Biosciences: 8100 ng

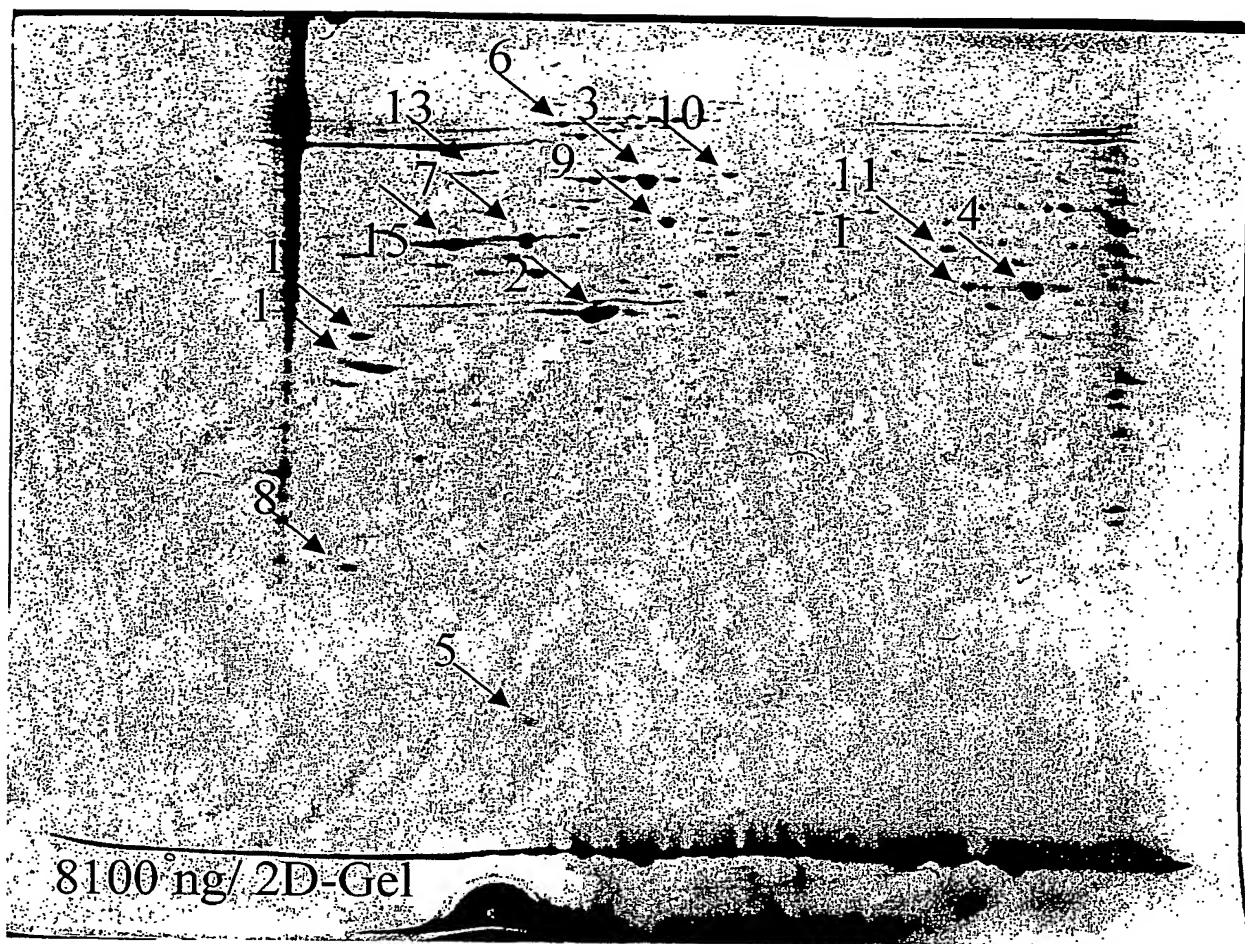


SYPRO Ruby: 8100 ng



Neue Silberfärbung : 300 ng

Figur 2



Figur 3

Spot-Nr.	Kolloidales Coomassie	Neue Silberfär- bung	Hoch- strasser	Amersham Biosciences
1	11	7	9	4
2	22	22	18	20
3	21	31	13	19
4	35	38	4	9
5	-	-	-	-
6	18	22	3	3
7	24	24	11	11
8	15	8	0	8
9	8	15	3	7
10	14	14	0	3
11	5	11	2	0
12	(~4)	(~4)	(~4)	(~4)
13	9	11	2	9
14	23	25	11	15
15	(~13)	(~13)	(~13)	(~3)
Mittelwert	17,1	19,0	6,3	9,0

Figur 4A

Spot	Name	Peptid Sequenz
1	Nucleophosmin	Peptide nicht geeignet zur Sequenzierung
2	Actin (isoform n.d.)	AVFPSIVGR GYSFTTTAER SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK
3	Heat shock protein cognate 70	DAGTIAGLNVLRD TVTNAVVTVPAYFNSQR SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK QTQFTTYSNQPGVLIQVYEGER
4	Enolase 1, alpha non neuron	GNPTVEVDLYTAK YITPDQLADLYK AAVPSGASTGIYEALER
5	no name, keratin contamination	
6	Heat shock protein 110 kDa	VLATAFDITLGG AGGIETIANEYSDR ELSTTLNADEAVTR EFSITDVVPYPISLR
7	Tubulin alpha 6	EIIDLVLDR AVFVDLEPTVIDEVR VGINYQPPTVVPGGDLAK TIGGGDDSFNTFFSETGAGK
8	tumor protein; translationally controlled 1 (21 kDa)	EIADGLCLEVEGK Cys_CAM
9	Chaperonin groEL precursor	TLNDELEIIEGMK CEFQDAYVLLSEK AAVEEGIVLGGGCALLR ISSVQSIVPALEIANHR
10	heat shock protein 74 kDa	VQQTVDLFR SDIGEVILVGGMTR Mox LLGQFTLIGIPPAPR NAVITVPAYFNSQR
11	Chaperonin subunit 2 (beta)	QVLLSAAEADEVLR EALLSSAVDHGSDEAR
12	Enolase 1, 2, or 3 (alpha, beta, or gamma)	AAVPSGASTGIYEALER
13	dnak-type molecular chaperone grp78 precursor	ITPSYVAFTPGER VTHAVVTVPAYFNDAGR DNHLLGTFDLTGIPPAPR
14	Lamin receptor 1; p40-3, functional ; p40-8, functional	FAAATGATPIAGR YVDIAIPCNNK FTPGTFTNQIAAFR AIVAIENPADVSVISSR
15	Tubulin (beta 2, 3 oder 5 oder Gemisch)	YLTVAAVFR PGQLNADLR ISEQFTAMFR ISEQFTAMFR Mox
		Mögliche Punktzahl: 4200

Figur 4B

Neue Methode	%	Colloidal Coomassie	%	Spot
				1
NH2-AVFPSIVGR-COOH NH2-GYSFTTT...-COOH NH2-SYELPDGQVITIGNER-COOH	100 70 100 0	NH2-AVFPSIVGR-COOH NH2-GYSFTTT...-COOH NH2-SYELPDGQVITIGNER-COOH NH2-...PVLLTEAPLNPK-COOH	100 70 100 67	2
NH2-DAGTIA...-COOH NH2-...VVTV...-COOH NH2-SINPDEAVAYGAQAAILSGDK-COOH	46 22 100 0	NH2-DAGTIAGLNVLR-COOH NH2-TVTNAVTVPAYFNDSQR-COOH NH2-SINPDEAVAYGAQAAILSGDK-COOH NH2-...PGVLIQVYEGER-COOH	92 100 100 50	3
NH2-GNPTVEVDLYTAK-COOH NH2-YITPDQLADLYK-COOH NH2-AAVPSGASTGIYEALER-COOH	100 100 100	NH2-GNPTVEVDLYTAK-COOH NH2-YITPDQLADLYK-COOH NH2-AAVPSGASTGIYEALER-COOH	100 100 100	4
				5
NH2-VLATAFDTT...-COOH NH2-...ETIA...-COOH NH2-ELSTTLNADEAVTR-COOH NH2-EFSITDVV...-COOH	69 29 100 87	NH2-VLATAFD...-COOH NH2-...ETIA...-COOH NH2-...TTLNA...-COOH	54 29 36 0	6
NH2-EIIDLVLDR-COOH NH2-AVFVDLEPTVIDEVR-COOH NH2-...YQPPTVV...AK-COOH NH2-...DSFNFFSETGAGK -COOH	100 100 50 70	NH2-EIIDLVLDR-COOH NH2-AVFVDLEPTVIDEVR-COOH NH2-...YQPPTVVP...-COOH NH2-...DSFNFFSETGAGK -COOH	100 100 44 70	7
NH2-EIADGLCLEV...-COOH	77	NH2-EIADGLCLEVEGK-COOH	100	8
NH2-TLNDELEIIEGMK-COOH NH2-CEPQDAYVLLSEK -COOH NH2-...EEGIVLGGGCALLR-COOH NH2-...QSIVPALEIA...R-COOH	100 100 82 61	NH2-TLNDELEIIEGMK-COOH NH2-CEPQDAYVLLSEK -COOH NH2-...EEGIVLGGGCALLR-COOH NH2-...SIVPALEIA...R-COOH	100 100 82 56	9
NH2-VQQTVDL...-COOH NH2-...VILVG...-COOH Max NH2-...TV...QR-COOH	73 36 0 27	NH2-VQQTVDL...-COOH NH2-...VILVG...-COOH Max NH2-...FTLI...-COOH NH2-...TV...QR-COOH	73 36 27 27	10
NH2-QVLLSAAEA...-COOH NH2-...DHGSD...-COOH	60 31		0	11
NH2-...PSGASTGI...-COOH	44	NH2-...PSGASTGI...-COOH	44	12
NH2-ITPSYVFT...-COOH NH2-...VVTVPAYF...-COOH NH2-...TGIP...-COOH	64 47 22		0	13
NH2-FAATGAT...-COOH NH2-YVDIAIPCNNK -COOH NH2-FTPGFTNQIAAFR -COOH NH2-AIVAIENPADVSVISSR-COOH	62 100 100 100	NH2-FAATGAT...-COOH NH2-YVDIAIPCNNK -COOH NH2-FTPGFTNQIAAFR -COOH NH2-AIVAIENPADVSVISSR-COOH	62 100 100 100	14
NH2-YLTVAAVFR-COOH NH2-ISEQFT...R-COOH NH2-ISEQFTAMFR-COOH	100 0 70 100	NH2-YLTVAAVFR-COOH NH2-PGQLNADLR -COOH NH2-ISEQFTAMFR-COOH NH2-ISEQFTAMFR-COOH	100 100 100 100	15
Erreichte Punktzahl:	2799		2819	
Prozent von möglichen Punkten:	67		67	

Figur 4C

Hochstrasser	%	Amersham Biosciences	%	Spot
				1
NH2-AVFPSIVGR-COOH	100	NH2-AVFPSIVGR-COOH	100	2
NH2-GYSFTTT...-COOH	70	NH2-GYSFTTT...-COOH	70	
NH2-SYELPDGQVITIGNER-COOH	100	NH2-SYELPDGQVITIGNER-COOH	100	
NH2-...PVLLTEAPLNPK-COOH	67	NH2-...PVLLTEAPLNPK-COOH	67	
NH2-...IA...-COOH	15	NH2-DAGTIAGLNVLR-COOH	92	3
NH2-...VVTV...-COOH	22	NH2-...VVTV...-COOH	22	
	0	NH2-SINPDEAVAYGAAVQAAILSGDK-COOH	100	
	0	NH2-...PGVLIQVY...-COOH	33	
NH2-...VE...-COOH	15	NH2-GNPTVEVDLY...-COOH	77	4
NH2-YITP...-COOH	33	NH2-YITPDQLADLYK-COOH	100	
NH2-AAVPSGASTGIYEALRLR-COOH	100	NH2-AAVPSGASTGIYEALRLR-COOH	100	
				5
NH2-...-COOH	0	NH2-...-COOH		6
NH2-...ETI...-COOH	21	NH2-...-COOH		
NH2-...-COOH	0	NH2-...-COOH		
NH2-...TDVV...-COOH	27	NH2-...-COOH		
NH2-EIIDLVLDR-COOH	100	NH2-EIIDLVLDR-COOH	100	7
NH2-AVFVDLEPTVIDEVR-COOH	100	NH2-...VDLEPTVI...-COOH	53	
	0		0	
	0		0	
-----	0		0	8
NH2-...EGIVLGGGALLR-COOH Cys_CAM	0	NH2-...EGIVLGG...-COOH	0	9
	0		0	
	76		41	
	0		0	
	0		0	10
NH2-QVLLSAAEA...-COOH	60			11
NH2-...PSGASTGI...-COOH	44	NH2-...PSGASTGI...-COOH	44	12
				13
NH2-FTPGTFTNQIAAFR -COOH	0	NH2-...AIENP...-COOH	0	14
NH2-AIVAIENPADVSVISSR-COOH	0		0	
	100		0	
	100		29	
NH2-YLTVAAVFR-COOH	100	NH2-YLTVAAVFR-COOH	100	15
NH2-PGQLNADLR -COOH	100	NH2-PGQLNADLR -COOH	100	
NH2-ISEQFT...R-COOH	70	NH2-ISEQFTA...R-COOH	80	
NH2-ISEQF...R-COOH	60	NH2-ISEQF...R-COOH	60	
	1480		1468	
	35		35	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/09923

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RABILLOUD T: "A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains" ELECTROPHORESIS, vol. 13, 1992, pages 429-439, XP001156152 page 429, right-hand column page 430; tables 1,2 page 431; table 3 page 438, left-hand column	1-5,7,8, 12, 14-18,20
Y	the whole document --- -/--	21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 November 2003

Date of mailing of the international search report

12/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Leber, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/09923

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LUDÁNY A ET AL.: "Skimmed-milk blocking improves silver post-intensification of peroxidase-diaminobenzidine staining on nitrocellulose membrane immunoblotting" ELECTROPHORESIS, vol. 14, 1993, pages 78-80, XP009020901 page 79, left-hand column	1-8,11, 12,14-16
Y	the whole document	21
Y	M. LARSEN ET AL.: "Characterization of differently processed forms of enolase 2 from Saccharomyces cerevisiae by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry" ELECTROPHORESIS, vol. 22, 2001, pages 566-575, XP002262909 ISSN: 0012-1797 abstract page 575, left-hand column	21
A	US 5 503 965 A (FUJI PHOTO FILM CO., LTD) 2 April 1996 (1996-04-02)	
A	US 5 824 458 A (FUJI PHOTO FILM CO., LTD) 20 October 1998 (1998-10-20)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/09923

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 5503965	A	02-04-1996	JP	3078431 B2	21-08-2000
			JP	7092625 A	07-04-1995
US 5824458	A	20-10-1998	JP	7239535 A	12-09-1995
			JP	7261340 A	13-10-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/09923

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	RABILLOU T: "A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains" ELECTROPHORESIS, Bd. 13, 1992, Seiten 429-439, XP001156152 Seite 429, rechte Spalte Seite 430; Tabellen 1,2 Seite 431; Tabelle 3 Seite 438, linke Spalte	1-5,7,8, 12, 14-18,20
Y	das ganze Dokument ---	21 -/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. November 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

12/12/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Leber, T

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LUDÁNY A ET AL.: "Skimmed-milk blocking improves silver post-intensification of peroxidase-diaminobenzidine staining on nitrocellulose membrane immunoblotting" ELECTROPHORESIS, Bd. 14, 1993, Seiten 78-80, XP009020901	1-8, 11, 12, 14-16
Y	Seite 79, linke Spalte das ganze Dokument	21
Y	M. LARSEN ET AL.: "Characterization of differently processed forms of enolase 2 from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry" ELECTROPHORESIS, Bd. 22, 2001, Seiten 566-575, XP002262909 ISSN: 0012-1797 Zusammenfassung Seite 575, linke Spalte	21
A	US 5 503 965 A (FUJI PHOTO FILM CO., LTD) 2. April 1996 (1996-04-02)	
A	US 5 824 458 A (FUJI PHOTO FILM CO., LTD) 20. Oktober 1998 (1998-10-20)	

INTERNATIONALER RECHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/09923

Im Rechenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5503965	A	02-04-1996	JP	3078431 B2	21-08-2000
			JP	7092625 A	07-04-1995
US 5824458	A	20-10-1998	JP	7239535 A	12-09-1995
			JP	7261340 A	13-10-1995